Folate

Français – 2001-07 – 1925369001 05 05

11820761 100 tests

Domaine d'utilisation
Test de liaison pour la détermination quantitative *in vitro* du folate dans le sérum humain. Ce test par électrochimiluminescence ''ECLIA'' est adapté aux dosages immunologiques sur les analyseurs Elecsys 2010 et MODULAR ANALYTICS E170 (module Elecsys) de Roche.

Tous les appareils ne sont pas disponibles dans tous les pays

Généralités*
Les anémies nutritionnelles et macrocytaires peuvent être dues à une carence en folate. La carence peut résulter d'un régime dépourvu de fruits crus, de légumes ou autres aliments riches en acide folique et se rencontre chez les alcooliques, les toxicomanes, les personnes âgées, les personnes de milieux sociaux défavorisés, etc. Par ailleurs, un taux sérique faible de folate au cours d'une grossesse a été associé à des malformations du tube neural du foetus.[1] La carence alimentaire et la malabsorption sont les causes principales des carences en folate.[2] Le folate est nécessaire pour un métabolisme normal, la synthèse de l'ADN et la régénération des globules rouges. En l'absence de traitement, les carences évoluent en anémie mégaloblastique. Les dosages de vitamine B_{12} et d'acide folique présentent un intérêt diagnostic pour le dépistage de carences en vitamine B_{12} ou en acide folique, en particulier dans le cadre du diagnostic différenciel de l'anémie mégaloblastique.
Les premiers tests radio-immunologiques pour la détermination du folate datent de 1973.[4-7] Tous utilisent comme traceur le folate marqué à l'iode 125 et des protéines de liaison naturelles (protéine de liaison du lait, protéine de liaison du folate). Les tests disponibles dans le commerce se distinguent par leurs techniques de séparation (libre ou liée) utilisées et par leur méthode de prétraitement de l'échantillon.
Le test Folate Elecsys utilise le principe par compétition à l'aide de la protéine de liaison naturelle du folate (folate binding protein = FBP) spécifique du folate. Le folate de l'échantillon entre en compétition avec le folate biotinylé ajouté pour les sites de liaison libres du complexe FBP marqué au ruthénium**.

**$(Ru(bpy)_3^{2+})$: Tris(2,2í-bipyridyl)ruthénium(II)

Principe*
Principe par compétition. Durée totale du cycle analytique : 27 minutes.
- 1ère incubation : Une prise d'échantillon de 15 µl (2010) ou de 30 µl (E170) est incubée avec les réactifs de prétraitement 1 et 2 du folate ; le folate lié est libéré des protéines de liaison qui sont immédiatement dénaturées à pH élevé.
- 2e Incubation : L'échantillon prétraité est incubé avec la protéine de liaison du folate marquée au ruthénium. Il se forme un complexe dont la quantité dépend de la concentration en analyte dans l'échantillon.
- 3e incubation : Les microparticules tapissées de streptavidine et le folate biotinylé sont ajoutées. Les sites libres de la protéine de liaison du folate marquée au ruthénium sont occupés ; il se forme un complexe folate biotinylé-protéine de liaison du folate marqué au ruthénium. Le complexe est lié à la phase solide par une liaison biotine - streptavidine.
- Le mélange réactionnel est aspiré dans la cellule de mesure, les micro-particules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe calibration. Une courbe de référence est mémorisée dans le code barres du réactif et est réajustée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en deux points.

Réactifs - Contenu du coffret et concentrations
Coffret Folate Elecsys , Réf. 11820761 - 100 tests
PT1 Réactif de prétraitement 1 (bouchon blanc), 1 flacon contenant 4,0 ml : monothioglycérol 12,66 g/l ; pH 5,5.
PT2 Réactif de prétraitement 2 (bouchon gris), 1 flacon contenant 4,0 ml: hydroxyde de sodium 37 g/l
M Microparticules tapissées de streptavidine (bouchon transparent), 1 flacon contenant 6,5 ml : Microparticules tapissées de streptavidine 0,72 mg/ml ; capacité de liaison : 470 ng biotine/mg microparticules ; conservateur.
R1 Protéine de liaison du folate~$Ru(bpy)_3^{2+}$ (bouchon gris), 1 flacon contenant 10 ml : Protéine de liaison du folate marquée au ruthénium 35 µg/l ; agent stabilisant ; sérumalbumine humaine; tampons borate, phosphate et citrate, pH 5,5 ; conservateur.
R2 Folate~biotine (bouchon noir), 1 flacon contenant 8,0 ml : conjugué folate~biotine 18 µg/l ; biotine 120 µg/l ; agent stabilisant; sérumalbumine humaine; tampon borate, pH 9,0 ; conservateur.

Précautions d'emploi et mises en garde
Pour diagnostic *in vitro*. Observer les précautions habituelles de manipulation en laboratoire. L'élimination de tous les déchets doit être effectuée conformément aux directives locales. Ce coffret contient parmi ses constituants les substances suivantes classées selon la directive 88/379/CEE:
PT1: Xn - NOCIF, R 20/21/22, S 45 (monothioglycérol)
Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).
PT2: C - CORROSIF, R 34, S 26, 37/39 (hydroxyde de sodium)
En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Provoque des brûlures. Porter des gants appropriés et un appareil de protection des yeux/du visage.
Les matériaux d'origine humaine ont fait l'objet d'une recherche des anticorps anti-HIV 1, anti-HIV 2, anti-HCV et de l'antigène HBs ayant conduit à un résultat négatif. Comme le risque d'infection ne peut être exclu avec certitude par aucune méthode, ce produit doit être utilisé avec le même soin que les échantillons de patients. En cas d'exposition, suivre les directives de l'autorité compétente en matière de santé.[8,9]

Préparation des réactifs*
Les réactifs contenus dans le coffret sont prêts à l'emploi et ne peuvent être utilisés séparément.
Toutes les informations nécessaires au déroulement du test sont mémorisées sur les codes barres des flacons réactifs et sont saisies automatiquement.

Conservation et stabilité*
Ranger le coffret Folate Elecsys entre 2 et 8°C **en position verticale**, de manière à ce que toutes les microparticules soient rassemblées lors de l'homogénéisation qui précède l'analyse.
Stabilité :
Avant ouverture, entre 2 et 8°C : jusqu'à la date de péremption indiquée.
Après ouverture, entre 2 et 8°C : douze semaines
Sur E170 et Elecsys 2010 : huit semaines

Prélévement et préparation des échantillons*
Sérum recueilli sur tube standard ou contenant un gel séparateur. Ne pas utiliser de plasma). (Critère d'acceptabilité: recouvrement 90–110% de la valeur du sérum ou pente 0,9–1,1 + coefficient de corrélation >0,95 + ordonnée à l'origine <± 2 x limite de détection analytique).
Stabilité : deux jours entre 2 et 8°C, un mois à -20°C. Ne congeler qu'une fois. Conserver à l'abri de la lumière.
Stabilité du sérum prélevé sur tube à gel séparateur :
24 heures entre 2 et 8°C (voir également la stabilité indiquée par le fabricant des tubes).[10]
Les échantillons qui contiennent un précipité doivent être centrifugés avant l'analyse.
Ne pas utiliser d'échantillons inactivés par la chaleur.
Ne pas utiliser d'échantillons ou solutions de contrôles stabilisés par de l'azide.
Remarque : l'hémolyse peut augmenter considérablement les taux de folate du fait des concentrations élevées de folate dans les globules rouges. Ne pas utiliser d'échantillons présentant une hémolyse.
Les échantillons de sérum destinés au dosage du folate doivent être prélevés sur des patients à jeun.
S'assurer avant l'analyse que la température des échantillons, des calibrateurs et des contrôles se situe à 20–25°C.
En raison des risques d'évaporation, il est recommandé de doser les échantillons, les contrôles et les calibrateurs dans les deux heures qui suivent leur mise en place sur les analyseurs.

Folate Elecsys - Réactifs et matériels nécessaires*
Contenu du coffret
Réf. 11820761, Coffret Folate Elecsys pour 100 tests
- PT1 Réactif de prétraitement 1
- PT2 Réactif de prétraitement 2
- M Microparticules tapissées de streptavidine
- R1 Protéine de liaison du folate~$Ru(bpy)_3^{2+}$
- R2 Folate~biotine

Réactifs et matériel auxiliaires nécessaires
- Réf. 11820877, Elecsys CalSet Elecsys, 4 x 1,6 ml
- Réf. 11731416, PreciControl Universal Elecsys : PreciControl Universal 1 : 2 x 3 ml et PreciControl Universal 2 : 2 x 3 ml
- Réf. 11732277, Diluent Universal Elecsys, 2 x 18 ml de milieu de dilution de l'échantillon ou Réf. 03183971, Diluent Universal Elecsys, 2 x 40 ml de milieu de dilution de l'échantillon
- Equipement habituel de laboratoire
- Elecsys 2010 ou MODULAR ANALYTICS E170

Matériel auxiliaire pour Elecsys 2010 :
- Réf. 11662988, ProCell Elecsys, 6 x 380 ml de tampon système
- Réf. 11662970, CleanCell Elecsys, 6 x 380 ml de solution de nettoyage pour la cellule de mesure
- Réf. 11930346, SysWash Elecsys, 1 x 500 ml, additif à la solution de lavage
- Réf. 11933159, Adaptateur pour SysClean
- Réf. 11706802, Assay Cup Elecsys 2010, 60 x 60 cuvettes réactionnelles
- Réf. 11706799, Assay Tip Elecsys 2010, 30 x 120 embouts de pipette
- Equipement habituel de laboratoire

Matériel auxiliaire pour MODULAR ANALYTICS E170:
- Réf. 12135019, ProCell M, 1 x 2 l de tampon système
- Réf. 12135027, CleanCell M, 1 x 2 l solution de nettoyage pour la cellule de mesure
- Réf. 03023141, PC/CC-Cups, 50 godets pour la thermorégulation de ProCell M et de CleanCell M
- Réf. 03004899, PreClean M, 5 x 600 ml, solution de lavage avant la détection
- Réf. 03005712, ProbeWash M, 12 x 70 ml, solution de lavage pour la fin de la série et pour le rinçage en cas de changement de réactif
- Réf. 12102137, AssayCups/AssayTips Combimagazin M, 48 blocs de 84 tubes à essai/embouts de pipettes, sacs pour déchets
- Réf. 03023150, WasteLiner (sacs pour déchets)
- Réf. 03027651, SysClean Adapter M, adaptateur pour SysClean M

Pour les trois appareils:
- Réf. 11298500, SysClean Elecsys, 5 x 100 ml, solution de lavage du système

Disponible uniquement aux Etats-Unis:
- Réf. 1832786, Folate CalCheck Elecsys, à trois niveaux de concentration

Mode opératoire*
Pour garantir le bon fonctionnement du test, se conformer au mode d'emploi de l'appareil utilisé et vérifier que les réactifs, les solutions auxiliaires et les consommables sont disponibles en quantité suffisante.

Folate

Folate **Elecsys® 2010/MODULAR ANALYTICS E170**

Français

L'analyseur effectue automatiquement l'homogénéisation des microparticules. Les informations spécifiques du test mémorisées sur l'étiquette code barres doivent être saisies. Si, exceptionnellement, le code barres ne peut être lu par l'appareil, saisir manuellement la série de 15 chiffres inscrits sur l'étiquette.
E170/Elecsys 2010 : porter les réactifs réfrigérés à env. 20°C et les placer dans le plateau réactifs de l'appareil thermostaté à 20°C. Eviter le formation de mousse. L'analyseur gère le contrôle de la température, l'ouverture et la fermeture des flacons.

Calibration*
Le test Folate Elecsys a été calibré par rapport à un test radio-immunologique pour la détermination du folate du commerce.[10] Le code barres du flacon réactifs contient toutes les informations spécifiques de la calibration du lot, la courbe de référence y est mémorisée. Le réajustement de la courbe pour l'appareil est effectué à l'aide de 2 solutions Folate CalSet Elecsys.
Fréquence de calibration : Effectuer une calibration par lot en utilisant un réactif frais (ayant été enregistré au maximum 24 heures par l'appareil).
Une nouvelle calibration est recommandée :
E170/Elecsys 2010 :
- après un mois (28 jours) pour un même lot de réactifs
- après sept jours pour un même flacon resté sur l'appareil
- quand elle s'avère nécessaire : par ex. si les résultats des sérums de contrôle se situent en dehors des limites de confiance.

Validation de la calibration : Le logiciel de l'appareil vérifie la validité de la courbe et affiche les anomalies.

Contrôle de qualité*
Utiliser PreciControl Universal 1 et PreciControl Universal 2 Elecsys ou d'autres contrôles appropriés.
Il est recommandé de doser les sérums de contrôle en simple au moins une fois par 24 heures pendant une routine, pour chaque nouveau coffret et lors d'une calibration. Cette fréquence peut varier selon les exigences du laboratoire. Les résultats doivent se situer dans les limites de confiance.
Chaque laboratoire établira la procédure à suivre si les résultats sont situés en dehors des limites de confiance.
Remarque : Certaines solutions de contrôles disponibles dans le commerce contiennent du folate 5-méthyltétrahydrique (MFTA). Leur utilisation est déconseillée pour le contrôle des dosages du folate.

Expression des résultats*
E 170 et Elecsys 2010 calculent automatiquement la concentration en folate de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés au choix en nmol/l ou en ng/ml.
Facteurs de conversion : nmol/l x 0,44 = ng/ml
ng/ml x 2,27 = nmol/l

Limites d'utilisation - interférences*[10]
La bilirubine (< 750 µg/l ou 1282 µmol/l), la lipémie (triglycérides < 15 g/l ou 1500 mg/dl) et la biotine (< 40 ng/ml) n'influencent pas les résultats. [Critère d'acceptabilité : recouvrement par rapport à la valeur initiale ± 0,5 ng/ml (1,1 nmol/l) pour des concentrations < 5 ng/ml (11 nmol/l), ou ± 10 % pour des concentrations > 5 ng/ml (11 nmol/l)].
Chez les patients traités par de fortes doses de biotine (> 5 mg/jour), il est recommandé d'effectuer le prélèvement de l'échantillon au moins 8 heures après la dernière administration.[10]
On n'a pas observé d'influence par le facteur rhumatoïde jusqu'à 400 U/ml.
L'influence de 56 médicaments fréquemment administrés a été recherchée *in vitro* : aucune interférence n'a été observée.
Le dosage du folate chez les patients traités par certains médicaments tels que le méthotréxate ou la leucovorine est contre-indiqué, ceux-ci ayant montré une réaction croisée avec la protéine de liaison du folate.
Dans de rares cas, des titres très élevés d'anticorps anti-streptavidine et anti-ruthénium peuvent conduire à des interférences.
Pour le diagnostic, les résultats du test Folate Elecsys doivent toujours être confrontés aux données de l'anamnèse du patient, au tableau clinique et aux résultats des autres examens.

Domaine de mesure*[10]
0,6–20 ng/ml (1,36–45,4 nmol/l): défini par la limite de détection et le maximum de la courbe de référence. Les taux situés au-dessous de la limite de détection sont exprimés de la manière suivante : < 0,6 ng/ml (< 1,36 nmol/l), et les taux situés au-dessus du domaine de mesure de la manière suivante : > 20 ng/ml (> 45,4 nmol/l).

Dilution des échantillons
Les échantillons présentant une concentration de folate > 20 ng/ml (> 45,4 nmol/l) peuvent être dilués manuellement au 1/2 dans le Diluent Universal. La concentration obtenue avec l'échantillon dilué doit être > 10 ng/ml (> 22,7 nmol/l). Multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution.
Remarque : Diluent Universal pouvant contenir de faibles concentrations de folate, utiliser, pour les études de linéarité, des sérums contenant une très faible quantité d'analyte. Les échantillons situés en dehors du domaine de mesure peuvent être dilués au 1/2 à l'aide du Diluent Universal. Aux concentrations obtenues après dilution, le folate endogène n'a pas d'influence significative sur le résultat du test.

Valeurs de référence*[10]
Compte tenu de la particularité des habitudes alimentaires, il est recommandé au laboratoire de déterminer ses propres valeurs normales à partir d'un nombre de dosages statistiquement significatif. Les valeurs suivantes, issues d'études réalisées aux USA et aux Pays-Bas, sont données à titre d'orientation.[10]

Région		(2,5e–97,5e percentiles)	
	n	ng/ml	nmol/l
USA	134	4,2 – 19,9	9,5 – 45,2
Europe	334	2,0 – 9,1	4,5 – 20,7

Chaque laboratoire devra vérifier la validité de ces valeurs de référence et établir ses propres valeurs selon la population examinée.

Performances analytiques*[10]
Précision
Les résultats indiqués ci-dessous ont été obtenus avec des analyseurs Elecsys. Les résultats obtenus au laboratoire peuvent différer de ceux-ci.
La reproductibilité a été déterminée à l'aide de pools de sérums humains et de contrôles, chaque échantillon a été analysé 6 fois par jour pendant 10 jours (n=60) selon un protocole modifié (EP5-A) du N.C.C.L.S. (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Les résultats suivants ont été obtenus ; précision intra-série sur E170 : n = 21.

Elecsys 2010			Précision intra-série			Précision intra-série		
Echantillon	x̄		s		CV	s		CV
	ng/ml	nmol/l	ng/ml	nmol/l	%	ng/ml	nmol/l	%
Sérum humain 1	7,6	17,2	0,29	0,66	3,9	0,38	0,86	5,0
Sérum humain 2	19,2	43,7	0,39	0,89	2,0	0,75	1,70	3,9
Contrôle 1	14,3	32,4	0,44	1,00	3,1	0,55	1,25	3,8
Contrôle 2	2,0	4,5	0,25	0,57	12,6	0,31	0,70	15,7

E170	Précision intra-série					Précision intra-série				
Echantillon	x̄		s		CV	x̄		s		CV
	ng/ml	nmol/l	ng/ml	nmol/l	%	ng/ml	nmol/l	ng/ml	nmol/l	%
Sérum humain 1	4,05	9,19	0,11	0,25	2,7	3,90	8,85	0,14	0,32	3,6
Sérum humain 2	10,7	24,4	0,17	0,39	1,6	8,88	20,2	0,22	0,49	2,4
Sérum humain 3	16,3	36,9	0,27	0,61	1,7	24,7	56,0	0,43	0,97	1,7
PreciControl U 1	6,55	14,9	0,10	0,22	1,5	6,70	15,2	0,16	0,36	2,4
PreciControl U 2	1,88	4,28	0,09	0,22	5,0	1,81	4,11	0,16	0,35	8,6

Sensibilité (limite de détection analytique)
La limite de détection se situe à 0,6 ng/ml (1,36 nmol/l).
La limite de détection correspond au taux le plus faible de folate mesurable qui puisse être différencié de zéro. Elle représente la concentration du standard le plus faible de la courbe de référence + 2s (calibrateur de référence, standard 1 + 2s, précision intra-série n = 21).

Spécificité analytique[10]
Le test montre des réactions croisées avec les substances suivantes :
aminoptérine 2,7%
améthoptérine 2,3%
acide folinique 2,3%

Comparaison de méthodes
Une comparaison du test Folate Elecsys (y) avec un test de liaison Folate radio-immunologique du commerce (x) a été effectuée sur des sérums de patients hospitalisés. Elle a permis d'établir les corrélations suivantes (ng/ml) :
Nombre d'échantillons analysés : 225

Passing/Bablok[11-13]	Régression linéaire
y = 0,29 + 0,90x	y = 0,60 + 0,78x
r = 0,964	r = 0,964
s(md68) = 0,683	Sy.x = 0,97

Les concentrations des échantillons étaient situées entre env. 1,5 et 16,9 ng/ml (env. 3,4 et 38,4 nmol/l).

Bibliographie

1 Rush, D.: Folate Supplements Prevent Recurrence of Neural Tube Defects, FDA Dietary Supplement Task Force. Nutrition Reviews, 50 (1): 22 - 28, 1992.
2 Herbert, V.: Drugs effective in megaloblastic anemias, in Goodman, L.S. and Gilman, A. (eds): The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5e édition, MacMillan Co., pp.1324-1349, 1975.
3 Herbert, V.: The assay and nature of folic acid activity in human serum, J. Clin. Invest., 40:81-91,1960.
4 Dunn, R.T., Foster, L.B.: Radioassay of serum Folate, Clin. Chem., 19:1101-1105, 1973.
5 Rothenberg, S.P., DaCosta, M., Rosenberg, B.S.: A radioassay for serum Folate: Use of a two phase sequential incubation, ligand-binding system, New Eng. J. Med., 285(25):1335-1339, 1972.
6 Gutcho, S., Mansbach, L.: Simultaneous radioassay of serum Folate and folic acid, Clin. Chem., 23:1609-1614, 1977.
7 BIO RAD Quantaphase® B-12/Folate Radioassay Instruction Manual, mars 1995.
8 Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration - 29 CFR Part 1910.1030 - Occupational Safety and Health Standards. Bloodborne Pathogens. Fed. Register July 1, 1998;6:267-280.
9 Council Directive (90/679/EEC). Official J. of the Eur. Communites No. L374, 31 déc. 1990.
10 Documentation de Roche
11 Passing H, Bablok W. A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. J Clin Chem Clin Biochem; 21:709–720, 1983.
12 Passing H, Bablok W. Comparison of Several Regression Procedures for Method Comparison Studies and Determination of Sample Sizes. J Clin Chem Clin Biochem; 22:431–445, 1984.
13 Bablok W et al. A General Regression Procedure for Method Transformation. J Clin ChemClin Biochem; 26:783–790, 1988.

* Pour de plus amples informations, se référer au manuel d'utilisation des analyseurs MODULAR ANALYTICS E170 et Elecsys 2010, au dossier information-produit Folate Elecsys et aux notices d'utilisation Folate Elecsys, Folate CalSet, PreciControl Universal et Diluent Universal.

= Modifications importantes. Les modifications concernant les données contenues dans le code barres doivent être entrées manuellement.

© 2001 Roche Diagnostics

Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim

2001-07

1925369001 06 05

Roche